

氏 名	今 井 茂 雄
生 年 月 日	
本 籍	愛知県
学 位 の 種 類	博士(理学)
学 位 記 番 号	博甲第488号
学位授与の日付	平成14年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	生活環境におけるカルシウム化合物のバイオマツト形成と特徴－重金属による抗菌作用機構－
論文審査委員(主査)	田崎 和江(理学部・教授)
論文審査委員(副査)	加藤 道雄(自然科学研究科・教授) 奥野 正幸(自然科学研究科・助教授) 神谷 隆宏(理学部・助教授) 芝崎 靖雄(産業技術総合研究所中部センター・産学官連携コーディネーター)

学 位 論 文 要 旨

Biomats collected in Okinoerabu Island consist mainly of calcite, whereas the thin layers are formed by concentration of heavy metals. The accumulation of P and N are also observed at the same mineralized layers. These results suggest that the sediments and heavy metals deposition may have formed by the biological processes.

Ag-doped antibacterial ceramics for the scales sticking to urinals was investigated. The result give a possibility that antibacterial ceramics can reduced the scales of actual urinals. The mechanism of the bactericidal action of the silver-doped ceramics against bacteria was investigated. The result suggest that the bactericidal action of silver-doped ceramics is caused by the hydroxyl radical which is generated on the surface of the ceramics by light irradiation.

From these results, forming biomats on the surface of material are supposed to be effected by light Irradiation and it has important properties. Cyanobacteria and other photosynthetic bacteria grow and covered on the surface, light Intensity and oxygen concentration are decreased. The bactericidal activity of heavy metal is supposed to become low. This study has challenged the mechanism of biomats and biofilm formation in microbial ecology which were based on the bactericidal activity by light irradiation and oxygen concentration.

生活環境の中でも水が存在するところには微生物の増殖条件が整っていることが多い。身近なわれわれの生活環境で水と係わるトイレ・浴室・キッチン・洗面や給水・排水管などは、水や結露水とともに人の垢・排泄物・食べ物カス・洗剤等で栄養分に富む条件であり微生物増殖に適した環境となっている。

微生物によるフィルム状、被膜状、マット状、テラス状などの様々な形態の構造物は、その環境、特に水質（溶存イオン、pH、温度、酸化還元電位、有機物の存在、流速など）に大きく左右され異なった構造物を作る。例えば温泉水中に生息する微生物が水中のCaイオンを取り込み、カルサイト形成やシリカの生体鉱物化作用も知られている。

水圏における微生物のマクロからミクロの観察を行うため、実際のフィールドとして沖永良部島に焦点をあてた。この島の地下水は、高い Ca^{2+} 濃度を持ち、そのために生活環境における水洗用便器と水道管を短期間で閉塞させている典型的な場所である。沖永良部島におけるバイオマットの特性について、その鉱物学的・化学的・微生物学的研究を行った。沖永良部島は、石灰岩からなる島で地下水をはじめとして河川水は Ca^{2+} の含有量が高く、高アルカリ性となっている。

島内の水道水は地下水を利用しており、河川には Ca^{2+} が多く含まれ、場所によってはpHが10に達する高アルカリ性の環境となっている。本研究では知名町の水道水を洗浄水に用いている便器の吐水口部に形成したバイオマットと、別の水道水源の一つである赤嶺上水取水口におけるバイオマットについて研究を行った。知名町で約16年間使用していた水洗用便器吐水部にラメラ構造を有するバイオマットが形成した典型的な例である（Fig.1）。水洗便器や水道管にバイオマットが短時間に形成し、設備の機能障害という問題を多数引き起こしている。他の地域（鹿児島県奄美大島、島根県銅が丸鉱山、愛知県東栄町の産廃置き場、ロシアのバイカル湖の

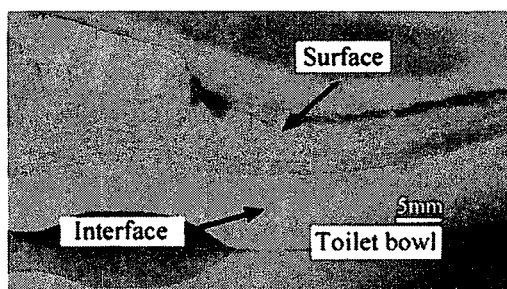


Fig. 1 Japan. The cross section of biomats formed on the toilet bowl at china-cho in Okinoerabu Island.

南ゼムチェックの温泉噴出口)に形成しているバイオマット採取した分析結果をあわせると、いずれも炭酸カルシウムを主成分とすることが観察された。いずれも緻密な部位と疎な部分からなる縞状構造で、バイオマット断面のEPMAによる元素マッピングの結果、Cu、Znなどの重金属を縞状もしくは局在した濃集部位を有していた。生物を構成する主要な元素であるP、Nについて沖永良部、奄美大島のバイオマットで重金属の層との一致を観察した（Fig. 2）。また、バイオマット表面は、ほぼ例外なくクロ

ロフィルと思われる緑色を呈し、表面を藻類やシアノバクテリアで覆っている。蛍光顕微鏡DAPI染色により微生物の存在を直接観察し、またEPMAとNCSコードによりP、Nの存在を確認し、バイオマツト周辺と内部には生物の痕跡が認められた。

重金属の層状に濃集とカルサイトを主体としたバイオマツトの形成によって、生活に身近な環境で水洗便器や水道管設備への汚れの付着と機能阻害が問題視されるが、 Ca^{2+} を炭酸塩の形で堆積させるとともに、水中の微量重金属を取り込むことで環境浄化という機能も有している。

また、使用中の便器の中の陶器表面に付着する黄色に着色した汚れ物質を採取し、DAPIによる蛍光顕微鏡下での観察の結果、DNAの存在による青白色の蛍光を呈することから材料表面には細菌が付着していることが明らかになった。なお、付着の初期においては陶器表面には結晶物は生じないが、実際に使用している小便器配管に付着した尿石汚れを分析した結果、水酸アパタイトが形成されていることが認められた (Fig. 3 a)。細菌の増殖によって材料表面のpHなどミクロレベルの環境が変化する結果、尿石 (水酸アパタイト) が生成することを実験的に証明した

(Fig. 3 b)。すなわち実際の尿石に付着している細菌と擬似的な尿組成であるCa添加尿素培地を用いた培養実験で、小便器の尿石汚れが再現できた。また、細菌の増殖により尿素の分解によってアンモニアが生成することも実験で確認することができた。

一方、Agを添加した抗菌セラミックス上では、尿石 (水酸アパタイト) は生成されなかった。すなわち、尿素をアンモニアに分解するウレアーゼ活性を有する細菌の増殖を抑えることでアンモニアの生合成が抑制された。

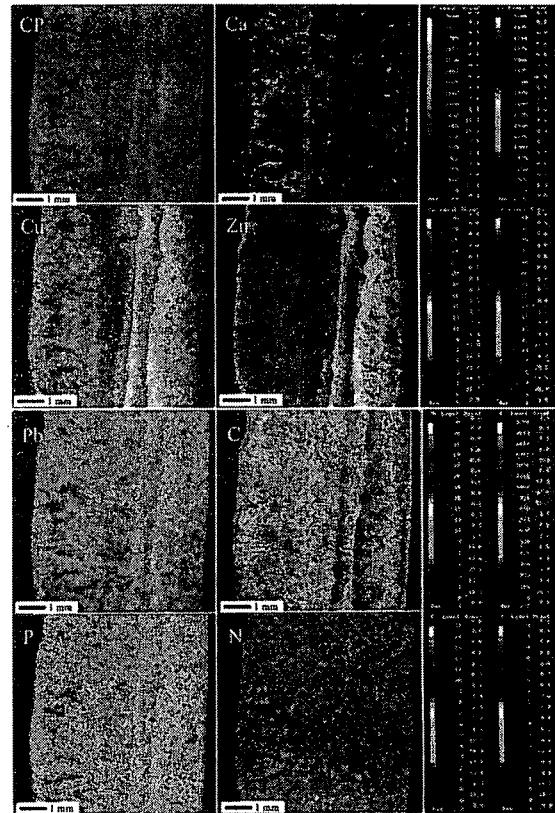


Fig. 2 Elemental color content maps of banded biomats formed on the toilet bowl at China-cho in Okinoerabu Island, showing distribution of a composition, such as Ca, Cu, Zn, Pb, C, P and N. CP; compositional image.

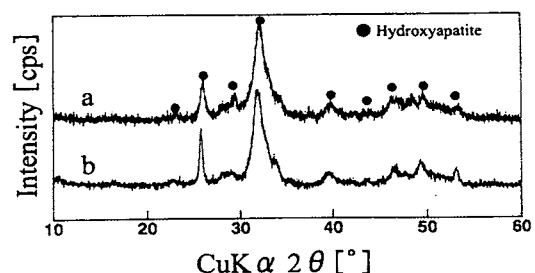


Fig.3 XRD analyses of biomats collected from the toilet bowl (a), and of biomats cultured for 24 days on the whitewares as a same material.

結果的に材料表面におけるミクロレベルのpHの上昇が抑えられ、水酸アパタイトの結晶化も抑えられたと考えられる。すなわち、材料表面の細菌増殖を抑えることで、結晶の析出を抑え、しいてはバイオミネラリゼーションを抑えることができることを示している。また、本実験により不快臭であるアンモニアの生成を抑制することが確認された。生活環境における住宅設備に付着する汚れであるバイオフィームやバイオマットを抑制する方法として、Agなどの抗菌物質を用いることが有効であることを示した。

次に、材料ごとに異なる表面での細菌の増殖への影響の違いを評価するため、材料表面からの距離を一定にすることができるフィルム

密着法 (35±1℃、24時間培養、n=1) を用い、細菌の濃度を一定にして栄養濃度ををかえてNB培地 (普通ブイヨン培地; 0、1/2000、1/1000、1/500、1/300、1/150NB) の下、大腸菌の懸濁液を調整し評価を行った。材料としては、陶磁器タイル、ガラス、黄銅、オーステナイト系ステンレス鋼 (SUS304)、ポリプロピレン (PP)、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン樹脂 (ABS)、ポリ塩化ビニル (PVC) である。その結果、*E.coli*を用いた接種菌液の栄養濃度 (0、1/2000NB、1/1000NB、1/500NB、1/300NB、1/150NB) を変化させることにより、材料固有の抗菌力の差を評価できることが明らかになった。

用いた材料では、抗菌力の大きな方から黄銅>オーステナイト系ステンレス鋼 (SUS304) >陶磁器タイル>ポリプロピレン (PP) ≧ガラス≒アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン樹脂 (ABS) ≒ポリ塩化ビニル (PVC) という結果であった (Fig. 4)。

抗菌力の差の原因は、各材料中に含まれる抗菌金属などの含有量の差である。栄養濃度を低くすると細菌の増殖の差が顕著になるということは、何らかの殺菌物質が抗菌金属から生成され、それが栄養などの有機物に作用するため殺菌力が低下するものと考えられる。

Ag添加セラミックスの抗菌作用機構を明らかにするため、光照射下での殺菌活性を評価し、溶出Agの影響をしらべ、その殺菌化学種を種々のラジカルトラップ剤を用いて検討した。その結果、以下のことを明らかにした。

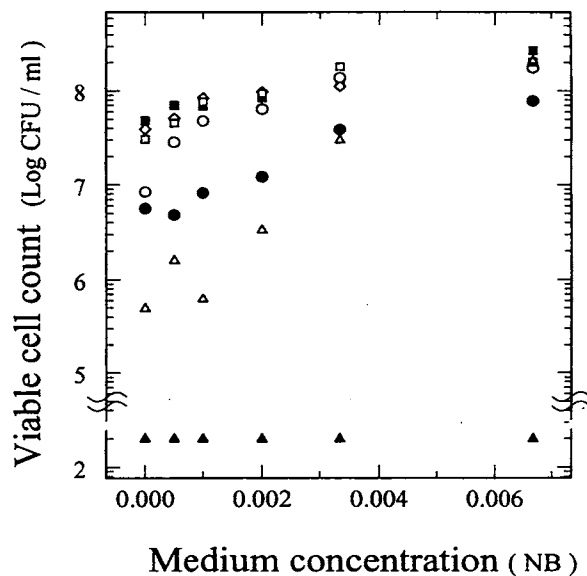


Fig.4 Relation between medium concentration and viable cell counts. Symbols: ◇, PP; ○, ABS; □, PVC; ▲, brass; △, SUS; ■, glass; ●, non-treated ceramic glaze.

Ag添加セラミックスは可視光照射下で高い殺菌効果を示す。ICP測定によりセラミックス表面からのAgイオンの溶出はなく、上澄液に殺菌活性がないことから、溶出Agイオンは殺菌作用に寄与しないことが明らかとなった。また、ラジカルトラップ剤であるL-システイン、L-アラニンや I^- の存在下では、著しく殺菌効果が低下し、60分間光照射後、Ag添加セラミックスを除去した場合でも、殺菌活性は持続した。さらに、L-システインの添加によって活性低下が認められた。Ag添加セラミックスは*Bacillus subtilis* ATCC6633に対しても殺菌作用があったことから、Ag添加セラミックスの殺菌作用は、光照射によりセラミックス表面で発生したヒドロキシルラジカル($\cdot OH$)が菌体内でリビングラジカルとなって、持続的な殺菌活性を示すことが明らかとなった (Fig. 5)。

また、光触媒作用の活性発現機構や反応機構の分子レベルでの解明のため、Ag添加セラミックスを用い一酸化窒素(NO)を導入し紫外線光の照射実験を行った。その結果、常温においても光触媒反応が得られ、 NO が N_2O と微量量の NO_2 に直接分解できることを見出した。

以上の研究結果を総括すると、微生物は水中に溶存している無機イオンや有機物を利用し材料表面で付着しながら増殖を行い、増殖に従って材料表面ならびに微生物周囲のミクロな環境を変化させていく、沖永良部をはじめ各所の堆積物を調査・観察した結果、いずれも堆積物は緻密な構造物ではな

く、無機的な形成だけではないことが示唆された。また、断面のミクロン単位の縞状の構築物は堆積過程における環境の変化を示しているもので断面の層状はEPMAによる元素マッピングの結果、Cu、Znなどの重金属を層状もしくは局在した濃集部位を有していた。また、生物を構成する主要な元素であるP、Nについて沖永良部、奄美大島のバイオマットで顕著な重金属の層との一致を観察した。これら殺菌化学種であるCu、Znなどの重金属は、それは光照射によることを明らかにすることで、フィールドにおける堆積物の調査を総合すると、これらの重金属が固定化されるためには、光照射を妨げることが必要である。

シアノバクテリアのような厚い細胞壁を有する微生物が固相表面を覆い、

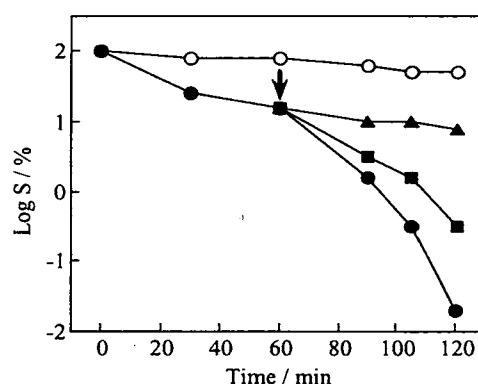


Fig.5 Effect of cysteine as super oxide anion scavenger on the bactericidal activity of antibacterial ceramics against *E. coli*.

○ : control (undoped ceramics), ● : cysteine-not added (Ag-doped ceramics), ■ : cysteine-not added (ceramics-removed), ▲ : cysteine-added (ceramics-removed). The arrow in the figure indicates the time at which antibacterial ceramics was removed.

活性酸素のようなラジカルに対して抵抗力があるものが付着し、増殖しある厚さで覆い光合成により光を吸収する。そして、その下面で光が吸収され活性酸素の精製を抑制されることでバクテリアなどが増殖できる環境が整うのである。その後、バイオミネラリゼーションが進行し重金属の濃集がなされるとともに、Caなどの多孔質な縞状の構造物を構築しながら、その過程での溶存するイオンなどの水環境や微生物種の違いなどから、重金属も層状の構造物として固定化されるのではないかと推測している (Fig.6)。

微生物の増殖の結果、設備等の材料表面にバイオフィームやバイオマットを形成・着色した汚れが付着し材料を腐食する結果、悪臭を放ったり、美観を損なったり、設備や材料としての機能低下を引き起こし故障の原因となったりする。

このような場合、強力な洗剤や研磨剤を使って材料表面に付着した汚れを除去が必要となり、環境に大きな負荷をかけることとなる。バイオマットの形成のメカニズムを探ることで、材料表面への汚れや微生物の付着と形成メカニズムを知ることとなり、ひいては材料表面へのバイオフィームやバイオマット形成を防止する方法を開発することにつながると考えられる。

これまで、水環境における金属のもつ抗菌作用と金属のバイオミネラリゼーションの両面から研究した例は少なく、特に、その鍵となる光の環境因子からの視点の基礎的な研究はほとんどなかった。今後、これらの詳細を明らかにすることによって、自然界と生活環境に負荷をかけない衛生性の維持・製品寿命の確保が可能となるとともに、水質浄化などのためのバイオレメディエーションとして最も効率的なシステムを構築することに将来貢献できるものと思っている。

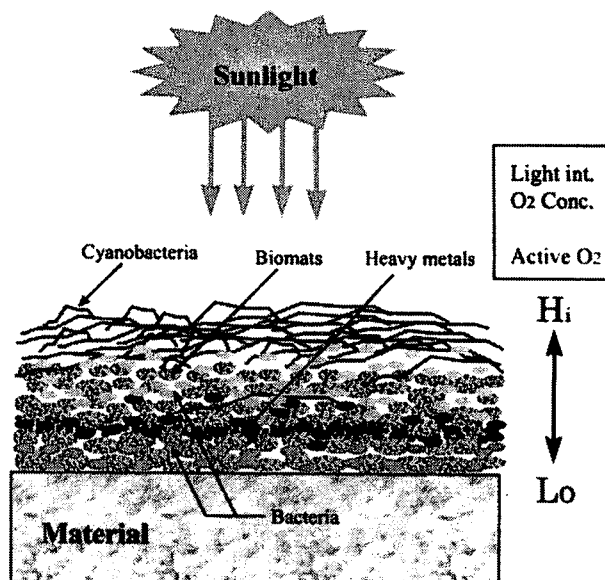


Fig. 6 Schematic model of the formation of biomats with layered heavy metals structure under photosynthesis. Cyanobacteria covered with the surface of material.

学位論文審査結果の要旨

今井茂雄氏の提出論文に対して、平成 14 年 1 月 19 日に第 1 回審査委員会の後、1 月 28 日に公開発表会、引き続き第 2 回審査委員会を行い、下記のとおり判定した。

本論文は、水と無機イオンと有機物が存在する環境において、微生物が材料表面に付着し、増殖することによって生じるバイオマットの形成について研究を行ったものである。野外の自然環境における材料表面に付着した物質を観察した結果、それらは緻密な無機物だけでなく、生物の痕跡と考えられる P, N が含まれ微生物の関与が示唆された。一方、便器に付着する尿石（水酸アパタイト）を生成させる実験を行った。さらに、Ag, Cu, Zn などの金属の持つ抗菌作用とそのメカニズムについて明らかにし、セラミックス表面に Ag を添加することで水酸アパタイトの生成が抑えられていることを証明した。すなわち、Ag の抗菌作用は、光触媒作用による殺菌化学種の一つであるヒドロキシルラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）によるものであることを明らかにした。これまで、水環境における抗菌作用と重金属のバイオミネラリゼーションの両面から研究した例は少なく、特に、その鍵となる環境因子を光とした基礎研究はほとんどなかった。これらの詳細を明らかにすることによって、自然界と生活環境に負荷をかけない衛生性の維持・製品寿命の確保が可能である。以上を総合し、審査委員会は、本論文が博士（理学）の学位を与えるのに十分な内容を有していると判断した。